

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際

(19)世界知的所有権機関
国際事務局(43)国際公開日
2004年10月14日 (14.10.2004)

PCT

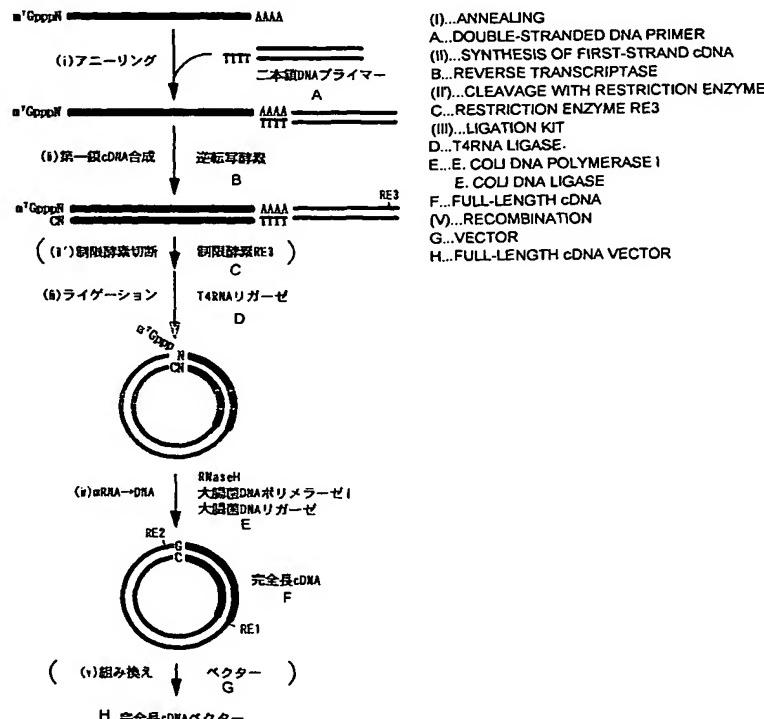
(10)国際公開番号
WO 2004/087916 A1

(51) 国際特許分類7:	C12N 15/09	Saitama (JP). 日立計測器サービス株式会社 (HITACHI INSTRUMENTS SERVICE CO., LTD.) [JP/JP]; 〒160-0004 東京都 新宿区 四谷四丁目 28 番 8 号 Tokyo (JP).
(21) 国際出願番号:	PCT/JP2004/004458	
(22) 国際出願日:	2004年3月29日 (29.03.2004)	(71) 出願人 および (72) 発明者: 加藤 誠志 (KATO,Seishi) [JP/JP]; 〒229-0014 神奈川県 相模原市 若松 3-4 6-5 O Kanagawa (JP).
(25) 国際出願の言語:	日本語	(72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 木村 知子 (KIMURA,Tomoko) [JP/IP]; 〒300-0032 茨城県 土浦市 湖北 2-9-1 エスパイエル土浦 715 Ibaraki (JP). 大床 国世 (OHTOKO,Kuniyo) [JP/JP]; 〒359-1115 埼玉県 所沢市 御幸町 13-9 リディアメゾン 205 Saitama (JP).
(26) 国際公開の言語:	日本語	
(30) 優先権データ:	特願2003-091373 2003年3月28日 (28.03.2003) JP	(74) 代理人: 西澤 利夫 (NISHIZAWA,Toshio); 〒107-0062 東京都 港区 南青山 6丁目 11番 1号 スリーエフ 南青山ビルディング 7F Tokyo (JP).
(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立身体障害者リハビリテーションセンター総長が代表する日本国 (JAPAN AS REPRESENTED BY DIRECTOR GENERAL OF NATIONAL REHABILITATION CENTER FOR PERSONS WITH DISABILITIES) [JP/JP]; 〒359-8555 埼玉県 所沢市 並木 4-1		

[統葉有]

(54) Title: METHOD OF SYNTHESIZING cDNA

(54)発明の名称: cDNA合成方法



- (I)...ANNEALING
- A...DOUBLE-STRANDED DNA PRIMER
- (II)...SYNTHESIS OF FIRST-STRAND cDNA
- B...REVERSE TRANSCRIPTASE
- (III)...CLEAVAGE WITH RESTRICTION ENZYME
- C...RESTRICTION ENZYME RE3
- (IV)...LIGATION KIT
- D...T4 RNA LIGASE
- E...E. COLI DNA POLYMERASE I
- F...COLI DNA LIGASE
- F...FULL-LENGTH cDNA
- (V)...RECOMBINATION
- G...VECTOR
- H...FULL-LENGTH cDNA VECTOR

WO 2004/087916 A1

(57) Abstract: A method of synthesizing a cDNA having a consecutive sequence from a nucleotide adjacent to the cap structure of mRNA which comprises: (i) the step of annealing an RNA mixture containing the mRNA having the cap structure with a double-stranded DNA primer; (ii) the step of synthesizing a first-strand

[統葉有]



(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL,

SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 國際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

cDNA from the double-stranded DNA primer with the use of a reverse transcriptase to give a ligation of an mRNA/cDNA heteroduplex with the double-stranded DNA primer; and (iii) the cyclization step of linking the 3' -end and the 5' -end of the ligation of mRNA/cDNA heteroduplex with the double-stranded DNA primer with the use of a ligase. According to this method, a full-length cDNA having a consecutive sequence from a nucleotide at the initiation point can be efficiently synthesized from a trace amount of RNA via a small number of steps.

(57) 要約: mRNAのキャップ構造に隣接するヌクレオチドからの連続配列を有するcDNAを合成する方法であって、(i)キャップ構造を有するmRNAを含むRNA混合物に、二本鎖DNAプライマーをアニールする工程、(ii)二本鎖DNAプライマーから逆転写酵素により第一鎖cDNAを合成してmRNA/cDNAヘテロデュプレックスと二本鎖DNAプライマーの連結体を調製する工程、および(iii)mRNA/cDNAヘテロデュプレックスと二本鎖DNAプライマーの連結体のcDNAを含むDNA鎖の3'端と5'端を、リガーゼを用いて連結し環状化する工程、を含む方法。微量のRNAから、少ない工程で、転写開始点ヌクレオチドからの連続配列を有する完全長cDNAを効率的に合成することを可能とする。

明細書

cDNA 合成方法

5

技術分野

この出願の発明は、cDNA の合成方法に関するものである。さらに詳しくは、
10 この出願の発明は、mRNA のキャップ構造に隣接するヌクレオチドからの連続配列を有する cDNA を、簡便かつ高効率で合成する新しい方法に関するものである。

15

背景技術

ゲノムプロジェクトによって、ヒト、マウス、イネ、線虫、酵母など様々な生物の全遺伝子情報を網羅するゲノム DNA（染色体 DNA）の全長配列がほぼ決定された。これらのゲノムの全長配列から期待されることは、遺伝子がコードしている蛋白質の一次構造に関する情報と、遺伝子の発現を調節している発現制御領域（プロモーター、エンハンサー、サプレッサー等）に関する情報である。これら二つの情報をゲノム配列から抽出するためには、染色体 DNA の遺伝子領域から転写される mRNA の配列情報が必要であるが、この mRNA の配列情報を解析するためには、mRNA に相補的な DNA (complementary DNA : cDNA) が通常用いられている。特に、前記二つの情報を得るために、遺伝子転写領域から正確に転写され、かつ、蛋白質コード領域の全てを含む mRNA から合成された cDNA（完全長 cDNA）を取得する必要がある。

通常、完全長 cDNA に対しては、二つの条件が設定されている。一つは、ゲノム DNA の転写開始点から始まる配列を有することである。転写開始点から正

しく転写された mRNA の 5'端には「キャップ構造」が付加される。このキャップ構造は、7?メチルグアノシン (m^7G) が転写開始点ヌクレオチドに 5'-5' 三リン酸橋を介して結合したものであり、このキャップ構造を有する mRNA に対して相補的な cDNA は完全長 cDNA の一つの条件を満たすことになる。もう一つの指標は、mRNA における「ポリ(A)テール」の存在である。このポリ(A)テールは、ゲノム DNA から転写された mRNA の 3'端に核内で付加される数十から 200 個のアデニン(A)連続配列である。従って、5'側にキャップ構造を有し、3'側にポリ(A)テールを有する mRNA を鋳型として正確に合成された cDNA は、完全長 cDNA の二つの条件（転写開始点から始まり、蛋白質コード領域の全てをカバーする）を満たすことになる。

cDNA は、mRNA を鋳型として逆転写反応により合成することができるが、染色体 DNA から転写された mRNA は細胞内で、あるいは細胞外への抽出および DNA 鎮への合成過程で様々な分解反応に曝されるため、完全長 cDNA の合成は容易ではない。また、mRNA を鋳型とする逆転写反応は、mRNA の 3'側にプライマーオリゴヌクレオチドをアニールさせ、このプライマーから mRNA の 5'方向へ DNA 鎮（第一鎖 cDNA）を合成する。従って、例えば、ポリ(A)テールにプライマー（オリゴ dT）をアニールすれば、ポリ(A)テールをカバーする cDNA は比較的容易に得ることができる。しかしながら、この方法は、プライマーからキャップ構造までの完全長 cDNA 合成を保証しない。mRNA が分解していたり、DNA 鎮の合成反応が途中で中断することが頻繁に生じるためである。事実、現在までに EST (Expressed Sequence Tag) として膨大な数の配列情報が報告されているが、これらは分解した mRNA から生成した不完全 cDNA や、DNA 合成反応が中断された不完全 cDNA に由来するものが大半である。

25

そこで、mRNA の 5'端に存在するキャップ構造までの配列を含む完全長 cDNA を合成する方法が数多く提案されている。これらの方法は、原理に基づき次の 4 つに大きく分類することができる。

30 (1) テーリング法

キャップ部位まで伸長した第一鎖 cDNA に、末端転移酵素によってホモオリゴマーテールを付加する方法であり、Okayama-Berg 法（非特許文献 1）や Pruitt 法（非特許文献 2）がこれに含まれる。付加したテールの数を厳密に制御することができないため、数が多くすぎると塩基配列の解析が困難になる等の問題点を有している。

逆転写酵素の末端転移酵素活性によって第一鎖 cDNA の 3'端に付加した dC テールを利用する鋳型スイッチ法（特許文献 1）もこのテーリング法に含まれる。この際、付加される dC の数は、3~5 個と記載されている（非特許文献 3）。

10 (2) リンカーライゲーション法

第一鎖 cDNA を合成後、アルカリ処理や RNaseH 処理によって mRNA を分解除去した後、一本鎖 cDNA の 3'端に、配列既知の一本鎖オリゴヌクレオチドリンクカーを T4 RNA リガーゼを用いて連結する方法である（非特許文献 4）。一本鎖 cDNA が二次構造を形成するため高品質の cDNA ライブラリーを作製するには向かない。

(3) オリゴキャッピング法

キャップ構造をオリゴマーで置換する方法である。オリゴマーとして、RNA オリゴマー（非特許文献 5）や DNA-RNA キメラオリゴマーを用いる方法（例えば、この出願の発明者らによる特許文献 1、非特許文献 6）が報告されている。原理的には、完全長 cDNA のみが合成されるはずであるが、約 5-10 μg という多量のポリ(A)+RNA を必要とし、mRNA を処理する工程が多く、この段階で分解された mRNA から合成された cDNA が含まれる場合もある。mRNA の分解を抑えるために、全 RNA を出発材料とすることにより、完全長率を 90% 以上とした例もあるが、工程数は変わらない（特許文献 2）。

過ヨウ素酸酸化反応によってキャップ構造の糖を開裂した後、合成オリゴマーを付加する方法（特許文献 3）もこの方法に含まれる。

(4) キャップトラッピング法

30 キャップ構造を有する mRNA を選別して鋳型とする方法であり、抗キャップ

抗体によって選別した mRNA を鋳型にする方法（非特許文献 7）や、過ヨウ素酸酸化反応によってキャップ構造の糖を開裂した後、ビオチンを付加し、アビジョン固定化担体で選別した mRNA を鋳型として用いる方法（非特許文献 8）などがある。

5

特許文献 1：米国特許第 5,962,272 号

特許文献 2：特許 3337748 号

特許文献 3：国際公開第 01/04286 号パンフレット

特許文献 4：米国特許第 6,022,715 号

10 非特許文献 1：Okayama, H. and Berg, P. Mol. Cell. Biol. 2:161-170, 1982.

非特許文献 2：Pruitt, S.C., Gene 66:121-134, 1988.

非特許文献 3：CLONTECHniques, July 1997, p.26.

非特許文献 4：Edwards, J., Delort, J., and Mallet, J. Nucleic Acids Res. 19:5227-5232, 1991.

15 非特許文献 5：Maruyama, K and Sugano, S. Gene 138:171-174, 1994.

非特許文献 6：Kato et al., Gene 150:243-250, 1994.

非特許文献 7：Edery, I., Chu, L.L., Sonenberg, N., and Pelletier, J. Mol. Cell. Biol. 15:3363-3371, 1995.

非特許文献 8：Carninci et al., Genomics 37:327-336, 1996.

20

発明の開示

前記のいずれの従来方法によっても完全長 cDNA の合成は可能である。しか

25 しながら、合成された cDNA のうち、完全長 cDNA が占める割合がどれだけ多くとも、分解した mRNA に由来する不完全 cDNA や、DNA 合成が途中で中断して生成した不完全 cDNA も必ず含まれる。このため、合成された cDNA がキャップ構造を有する完全長 mRNA に由来するものであるか否かを判定する必要がある。一般的には、同じ 5'端配列を有するクローンが複数個存在すれば、それらは完全長 mRNA に由来するものである可能性は高いが、断定はできない。

とりわけ、複数の転写開始点を有する遺伝子の場合には、完全長 mRNA に由来する cDNA クローンであるか、5'端が欠失した分解産物由来のクローンであるかを決定することは極めて困難である。

5 従って、完全長 cDNA を高い割合で合成し、かつ転写開始点から始まる配列を有していることを識別することのできる cDNA 合成方法が求められている。

また、前記のいずれの従来方法も、多くの工程を必要とするという問題点を有している。例えば、特許文献 1 のオリゴキャッピング法は、確実にキャップ部位 10 からの塩基配列を含む cDNA を合成可能であるという点において優れた方法ではあるが、cDNA の合成までに 8 工程を要する。工程の増大は、cDNA の合成収率の低下や、時間や労力、コストの増加といった問題を引き起す。

さらに、従来法のいくつかは PCR による增幅工程を含んでいる（非特許文献 15 4、5）。しかしながら、PCR に用いる DNA ポリメラーゼはポリメラーゼ反応時に鋳型と異なるヌクレオチドを取り込む頻度が高いため、cDNA 配列中に人工的な変異を生成するという問題点を有していた。

従って、微量の RNA から、PCR を使用せずに少ない工程で完全長 cDNA の合成を可能とする方法が求められていた。

この出願の発明は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであり、以下の条件：

- (1) 1 μg オーダーの全 RNA を出発材料とすること；
- 25 (2) PCR を使用しないこと；
- (3) できるだけ少ない工程であること；
- (4) 転写開始点ヌクレオチドからの連続配列を有することが保証された完全長 cDNA を 90% 以上の高収率で合成すること、
を満たす方法を提供することを課題としている。従来方法の中には、これらの 30 要件をすべて満たすものはない。

前記の課題を解決するための第 1 の発明は、mRNA のキャップ構造に隣接するヌクレオチドからの連續配列を有する cDNA を合成する方法であって、

(i) キャップ構造を有する mRNA を含む RNA 混合物に、二本鎖 DNA プライマーをアニールする工程、

(ii) 二本鎖 DNA プライマーから逆転写酵素により第一鎖 cDNA を合成して mRNA/cDNA ヘテロデュプレックスと二本鎖 DNA プライマーの連結体を調製する工程、および

(iii) mRNA/cDNA ヘテロデュプレックスと二本鎖 DNA プライマーの連結体の cDNA を含む DNA 鎖の 3'端と 5'端を、リガーゼを用いて連結し環状化する工程、

を含むことを特徴とする方法である。

この第 1 発明の方法においては、キャップ構造を有する mRNA が細胞抽出物中に含まれていること、またはキャップ構造を有する mRNA がインビトロ転写によって合成されたものであることをそれぞれ好ましい態様としている。

またこの第 1 発明の方法においては、二本鎖 DNA プライマーのプライマー配列が、キャップ構造を有する mRNA の部分配列に相補的な配列を含むこと、またはキャップ構造を有する mRNA のポリ(A)配列に相補的なオリゴ dT を含むことをそれぞれ好ましい態様としている。

さらにこの第 1 発明の方法においては、リガーゼが T4 RNA リガーゼであることを別の好ましい態様としている。

この第 1 発明の方法においては、工程(ii)と工程(iii)の間に、mRNA/cDNA ヘテロデュプレックスと二本鎖 DNA プライマーの連結体を制限酵素で切断することにより、二本鎖 DNA プライマーの端部に 5'突出末端あるいは平滑末端を生成する工程(ii')を含むことを別の好ましい形態としている。

第 2 発明は、前記第 1 発明の方法に加え、さらに以下の工程：

- (iv) mRNA/cDNA ヘテロデュプレックスと二本鎖 DNA プライマーの連結体の RNA 鎮を DNA 鎮に置換して第二鎮 cDNA を合成する工程、
を含むことを特徴とする cDNA 合成方法である。

5

この第 2 発明の方法においては、二本鎖 DNA プライマーが複製オリジン、または複製オリジンと cDNA 発現用プロモーターを含んでいることを好ましい態様としている。

- 10 この第 2 発明の方法によって、合成された二本鎖 cDNA を含むクローンが得られる。

この第 2 発明の方法は、さらには以下の工程：

- 15 (v) 第一鎮 cDNA と第二鎮 cDNA とからなる二本鎖 cDNA をベクターDNA の一部とする工程、
を含むことを別の好ましい態様としている。これによって、合成された二本鎖 cDNA がベクターにクローニングされる。

- 20 第 3 発明は、前記第 2 発明の方法によって合成された二本鎖 cDNA を含むクローンの集団であって、5'端にヌクレオチド (dT)_n dG ($n=0 \sim 5$) を有し、これに連続して mRNA のキャップ構造に隣接するヌクレオチドからの連続配列を有する cDNA のクローンを 60%以上含むことを特徴とする cDNA ライブライアリーアリーナである。

- 25 第 4 発明は、前記第 3 発明の cDNA ライブライアリーナのクローンから、mRNA のキャップ構造に隣接するヌクレオチドからの連続配列を有する cDNA のクローンを選択する方法であって、5'端ヌクレオチドが(dT)_n dG ($n=0 \sim 5$) である cDNA を含むクローンを目的クローンとする方法である。

- 30 第 5 発明は、プライマー部分がオリゴ (dT) _n ($n=15 \sim 100$) からなり、ブ

ライマー側の末端部分に 8 塩基認識制限酵素切断部位 RE1 を有し、もう一方の末端部に 8 塩基認識制限酵素切断部位 RE2 と 5'突出末端あるいは平滑末端を生成する制限酵素部位 RE3 を有する二本鎖 DNA プライマーである。

- 5 第 5 発明の二本鎖 DNA プライマーは、複製オリジン、または複製オリジンと cDNA 発現用プロモーターを含んでいることを好ましい態様としている。そして、この第 5 発明の二本鎖 DNA プライマーの具体例は、配列番号 2 の塩基配列を有する pGCAP10 由来のベクタープライマーである。
- 10 第 6 発明は、二本鎖 DNA プライマー、逆転写酵素と反応緩衝液、T4 RNA リガーゼと反応緩衝液、キャップ付加モデル mRNA を含む cDNA 合成用試薬キットである。

前記のとおりの発明は、少なくとも

- 15 (i) mRNA への二本鎖 DNA プライマーのアニール、
(ii) 第一鎖 cDNA の合成による mRNA/cDNA ヘテロデュプレックスと二本鎖 DNA プライマーの連結体の調製、および
(iii) mRNA/cDNA ヘテロデュプレックスと二本鎖 DNA プライマーの連結体の cDNA を含む DNA 鎖の 3'端と 5'端の連結、
20 という三段階の工程によって、mRNA のキャップ構造に連続する塩基配列を有する cDNA を高効率で合成する方法である。

すなわちこの発明は、キャップ構造を有する mRNA が鋳型となる場合には、前記工程(ii)によって、キャップ構造の塩基が「G」の場合には「dC」〔または 25 5'-dC(dA)n-3'(n=1-5)〕が第一鎖 cDNA の 3'端に付加されることを見いだして完成された。キャップ構造の塩基が「A」の場合には「dT」〔または 5'-dT(dA)n-3'(n=1-5)〕が第一鎖 cDNA の 3'端に付加されることから、付加されるヌクレオチドはキャップ構造の塩基に相補的な塩基を有するものであることが示された。また、キャップ構造を有さない RNA を鋳型にした場合には、第一鎖 30 cDNA の 3'端に余分なヌクレオチドの付加は認められなかった。したがって、

cDNA の 5'端に余分な「dG」 [または 5'-(dT)_n dG -3'(n=1-5)] が存在する場合には、この cDNA はキャップ構造を有する mRNA に由来する完全長 cDNA であると判定できる。逆転写酵素の反応条件によっては、余分な「dG」が 2 個以上付加する場合もある（非特許文献 3）、一般的には cDNA の 5'端に(dN)_n 5 dG (dN は dT または dG、n=0~5) が存在する場合には、この cDNA はキャップ構造を有する mRNA に由来する完全長 cDNA であると判定できる。ただし、余分な「dG」が 2 個以上付加する場合、どれが余分な「dG」なのか判定が困難なので、実施例のように余分な「dG」が 1 個付加する条件で行なうのが好ましい。

10

なお、鑄型スイッチ法では 3~5 個の dC が付加されると記載されているが（非特許文献 3）、この発明の実施例の条件下においては、そのような複数個の dC 付加は認められなかった。また、逆転写酵素の末端転移酵素様活性により、第一鎖 cDNA の 3'端に優先的に dC が一個付加されるという報告があるが 15 (Schmidt, W.M. and Mueller, M.W., Nucleic Acids Res. 27:e31, 1999)、その機構に関する報告はない。さらに、RNA/DNA ヘテロデュプレックス（この発明におけるキャップ構造を有さない RNA/cDNA ヘテロデュプレックスに相当する）に逆転写酵素を作用させると、DNA の 3'端の 90% に一個のヌクレオチド（「dA」あるいは「dG」あるいは「dC」あるいは「dT」）が付加するとい 20 う報告があるが（Chen, D. and Patton, J.T., BioTechniques 30:574-582, 2001）、この発明の実施例の条件下においては、そのような付加はほとんど認められなかった。

なお、この発明において、「ヌクレオチド」とは、プリンまたはピリミジンが 25 糖に β -N-グリコシド結合したヌクレオシドのリン酸エステル（ATP、GTP、CTP、UTP；または dATP、dGTP、dCTP、dTTP）を言う。以下の説明において、前記のヌクレオチドはそれぞれ単に「A」、「G」、「C」、「U」、または「dA」、「dG」、「dC」、「dT」と記載することがある。また「相補的」とは、前記ヌクレオチドの「A」または「dA」と「U」または「dT」、「G」または「dG」と「C」または「dC」との水素結合による対合を意味する。

また、「二本鎖 DNA プライマー」とは、二本鎖 DNA の片方の DNA 鎮の 3' 端が突出しており、この突出した部分の塩基配列が鑄型 mRNA 配列に相補的な塩基配列を有するものを言う。この突出した部分は、鑄型 mRNA にハイブリダ
5 イズし、逆転写酵素による第一鎖 cDNA 合成時のプライマーとして働く。二本
鎖 DNA が複製オリジンを有するものを、特に「ベクタープライマー」と言う。

またさらに、この発明において「キャップ構造を有する mRNA」は、ゲノム
DNA からの転写産物 mRNA の 5'端に、メチル化されたグアニン(G)を有するグ
10 アノシンが 5'-5'三リン酸結合 (mGp5'-5'pp) した分子であり、例えば G の第
7 位がメチル化されたキャップ構造の場合には以下の構造：

5'-m⁷GN₁N₂N₃N₄N₅-----N_m-3' : (a)

(なお、N は A、G、C または U、m は 50 以上の正数)

を有している。

15

この発明における「mRNA のキャップ構造に隣接するヌクレオチドからの連
続配列を有する cDNA」とは、前記の mRNA 構造(a)における N₁～N_m 配列に相
補的な cDNA の 3'端に 5'-dC(dA)_n-3' (n=0~5) (より一般的には、5'-
20 dC(dN)_n-3' (dN は dA または dC、n=0~5)) が付加した cDNA (第一鎖
cDNA) :

3'-(dA)_ndCdN₁dN₂dN₃dN₄dN₅-----dN_m-3' : (b)

(なお、dN は dA、dG、dC または dT)

と、この cDNA(b)に対してさらに相補的な cDNA (第二鎖 cDNA) :

5'-(dT)_ndGdN₁dN₂dN₃dN₄dN₅-----dN_m-3' : (c).

25 および cDNA(b)/(c)のデュプレックス (二本鎖 cDNA) を全て意味する。ただし、
単に「cDNA」と言う場合には二本鎖 cDNA を言い、その塩基配列について言及
する場合には、前記構造(c)の第二鎖 cDNA のものを言う。

また、前記の mRNA 構造(a)における N₁ は、転写開始点のヌクレオチドであ
30 ることから、「mRNA のキャップ構造に隣接するヌクレオチドからの連続配列

を有する cDNA」とは、「転写開始点ヌクレオチドからの連続配列を有する cDNA」と定義することもできる。

以下の説明においては、「mRNA のキャップ構造に隣接するヌクレオチド (転写開始点ヌクレオチド) からの連続配列を有する cDNA」を、「キャップ連続 cDNA」と記載することがある。また、このキャップ連続 cDNA のうち、特に mRNA のポリ(A)配列までを含むものを「完全長 cDNA」と記載することがある。さらに、キャップ構造に隣接するヌクレオチド (前記の構造(b)または(c)における少なくとも dN₁) を含まない cDNA を「キャップ非連続 cDNA」と記載することがある。またさらに、「キャップ構造を有する mRNA」を「キャップ (+)mRNA」、「キャップ構造を持たない mRNA」を「キャップ(-)mRNA」、キャップ(+)mRNA からキャップ構造を除去したものを「脱キャップ mRNA」と記載することがある。

この発明におけるその他の用語や概念は、発明の実施形態の説明や実施例において詳しく規定する。またこの発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、この発明の遺伝子工学および分子生物学的技術は Sambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y, 1995 等に記載されている。

25

図面の簡単な説明

図 1 は、この発明の基本工程を示した模式図である。

図 2 は、この発明のベクタープライマーの一般的な構造を例示した模式図で 30 ある。

図 3 は、この発明の pGCAP1 並びに pGCAP1 ベクタープライマーの構造を例示した模式図である。

5 図 4 は、この発明の pGCAP10 並びに pGCAP10 ベクタープライマーの構造を例示した模式図である。

発明を実施するための最良の形態

10

第 1 の発明は、キャップ連続 cDNA（第一鎖 cDNA）を合成する方法であって、以下の工程(i)、(ii)および(iii)を必須として含むことを特徴としている（図 1 参照）。

15 工程(i)： キャップ構造を有する mRNA を含む RNA 混合物に、二本鎖 DNA プライマーをアニールする。

工程(ii)： 二本鎖 DNA プライマーから逆転写酵素により第一鎖 cDNA を合成して mRNA/cDNA ヘテロデュプレックスと二本鎖 DNA プライマーの連結体を調製する。
20

工程(iii)： mRNA/cDNA ヘテロデュプレックスと二本鎖 DNA プライマーの連結体の cDNA を含む DNA 鎮の 3'端と 5'端を、リガーゼを用いて連結し環状化する。

25

工程(i)において、「キャップ付加 mRNA を含む RNA 混合物」は、実質的にキャップ付加 mRNA のみからなるものであってもよく、その他に、例えば「キャップ(-)mRNA」および／または「他の RNA 分子（例えば rRNA、tRNA 等）」を含んでいてもよい。このような RNA 混合物は、単細胞真核生物由来のものであってもよく、多細胞真核細胞由来のものであってもよい。またこの RNA 混合
30

物は、DNA を錠型としてインビトロ転写により合成されたものでもよく、あるいは細胞抽出物としての全 RNA であってもよい。この工程(i)において、RNA 混合物は、例えば全 RNA の場合は $1\mu\text{g}$ 以下でも cDNA の合成は可能であるが、好ましくは $1\mu\text{g}$ 以上を使用する。細胞から抽出される全 RNA の場合、mRNA 5 は 2-3% であり、この発明の方法ではこのような少量の mRNA を含む全 RNA からキャップ連続 cDNA や完全長 cDNA を合成することが可能である。

工程(i)で使用する「二本鎖 DNA プライマー」は、その 3' 突出末端として「プライマー配列」を備えている。この場合のプライマー配列は、例えば、対象となるキャップ付加 mRNA の部分配列情報が公知の場合は、この公知配列に基づいて公知の化学合成法（例えば、Carruthers, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47:411-418, 1982; Adams, J. Am. Chem. Soc. 105:661, 1983; Belousov, Nucleic Acid Res. 25:3440-3444, 1997; Frenkel, Free Radic. Biol. Med. 19:373-380, 1995; Blommers, Biochemistry 33:7886-15 7896, 1994; Narang, Meth. Enzymol. 68:90, 1979; Brown, Meth. Enzymol. 68:109, 1979; Beaucage, Tetra. Lett. 22:1859, 1981; 米国特許第 4,458,066 号に記載されているような方法など）により作製することができる。例えば公知の EST (Expressed Sequence Tag) 配列は cDNA の 3' 側部分配列 20 がほとんどであるが、これらの配列に基づいて作製したプライマー配列を用いることによって、その EST 配列より 5' 側のキャップ連続 cDNA を取得することができる。また、mRNA のポリ(A) 配列に相補的なオリゴ dT を含むプライマーを使用することもできる。オリゴ dT を構成する連続した dT の数は、30~70 個程度が好ましく用いられる。このようなオリゴ dT プライマーの使用によって、ポリ(A)部位までを含むキャップ連続 cDNA (完全長 cDNA) を取得することができる。一方、このような二本鎖 DNA プライマーのプライマー配列の他端部は、25 特に制限はなく、任意の二本鎖 DNA とすることができますが、後の工程においてベクターDNAへの挿入連結を容易とするように、ベクターDNAのクローニングサイトへの連結末端を端部に備えるようにすることが好ましい。

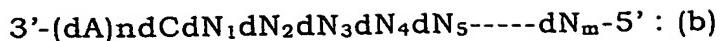
30 工程(ii)においては、mRNA にアニールした二本鎖 DNA プライマーに逆転写

酵素を作用させ、二本鎖 DNA プライマーの 3'端から mRNA の 5'方向に相補的な cDNA 鎖を合成する。この工程により、mRNA/cDNA ヘテロデュプレックスと二本鎖 DNA プライマーの連結体が形成される。この連結体では、mRNA/cDNA ヘテロデュプレックスの cDNA 鎖の一端と二本鎖 DNA プライマーの片側鎖の一端が連結している。またこの工程(ii)で生成される mRNA/cDNA ヘテロデュプレックスの cDNA は、キャップ(+)mRNA に相補的で、かつ 3'端に dC または 5'-dC(dA)n-3'を付加したキャップ連続 cDNA、またはキャップ(-)mRNA に由来するキャップ非連続 cDNA である。

10 逆転写酵素としては、M-MLV (Moloney murine leukemia virus)や AMV (avian myeloblastosis virus)由来の逆転写酵素が利用できるが、内在性の RNaseH 活性を無くしたもののが好ましい。

この工程(iii)におけるリガーゼとしては、各種の DNA リガーゼまたは RNA リガーゼを適宜に選択して使用できるが、好ましくは T4 RNA リガーゼを使用する。なお、T4 RNA リガーゼによって、RNA にハイブリダイズさせた 2 本のオリゴデオキシヌクレオチド同士を連結する方法（米国特許第 6,368,801 号）が報告されているが、mRNA/cDNA ヘテロデュプレックスに二本鎖 DNA を連結した例はない。また、ライゲーションは、mRNA/cDNA ヘテロデュプレックスと二本鎖 DNA プライマーの連結体を制限酵素で切断することにより、二本鎖 DNA プライマーの端部に 5'突出末端あるいは平滑末端を生成させる工程(ii')を行なった後、行なうことも好ましい。工程は一つ増えるが、cDNA インサートの入っていないベクターだけのバックグラウンドが減少することと、ライゲーション効率が上がるといった利点がある。また、mRNA/cDNA ヘテロデュプレックスのキャップ構造を、例えばタバコ酸性ピロホスファターゼを用いて除去してから行っても良いが、そのキャップ構造を残存させたまま行ってもよい。さらに、mRNA/cDNA ヘテロデュプレックスの mRNA を分解したり、あるいは mRNA 鎖を DNA 鎖に置換してからライゲーションを行なってもよい。ただし、この工程で生成する mRNA 分解産物が、cDNA の 3'端に付加する場合があるので、注意を要する。

以上 の方 法 に よ つて、



からなるキャップ連続 cDNA (第一鎖 cDNA) を一部とする環状 DNA 鎖が合成
5 される。このようにして得られたキャップ連続 cDNA は、例えばその配列解析
とゲノム配列との比較によって、遺伝子の転写開始点やその上流の発現制御領域
を特定するために情報を提供する。

以上 の方 法 に よ つて 得 ら れ た キ ャ ッ プ 連 続 cDNA (第一鎖 cDNA) は、第 2 発明
10 の 工 程 (iv) に よ つて 二 本 鎖 cDNA へ と 合 成 さ れ る。この 工 程 (iv) は、例 え ば、
RNaseH、大腸菌 DNA ポリメラーゼ I、大腸菌 DNA リガーゼ等を作用させて
RNA 鎖を DNA 鎖に置換する方法によって行うことができる。この工程はかなら
ずしも試験管内で行なう必要はなく、例 え ば、二 本 鎖 DNA プライマーとして
「ベクタープライマー」を用いれば、ライゲーション後、大腸菌などに導入し、
15 細胞内で RNA 鎖を DNA 鎖に置換してもよい。

また 第 2 発明の方法では、二 本 鎖 cDNA を、工 程 (v) に よ つて ベクターにクロ
ーニングすることもできる。例 え ば、二 本 鎖 DNA 部 分 に 備 え ら れ た 制 限 酵 素 部
位で切断後、プラスミドベクターやファージベクターなどに挿入するなどして、
20 配列解析やその発現産物の产生等に使用することができる。

なお、この第 2 発明の方法では、二 本 鎖 DNA プライマーとして「ベクタープ
ライマー」を用いれば、他のベクターへの挿入工程を省略することができるので
好ましい。ベクタープライマーは、例 え ば、環状ベクター-DNA を適当なクロー
25 ニングサイトで制限切断し、その 3' 端に mRNA の一部配列に相補的なプライマ
ー配列を連結して 3' 突出末端とすることによって作製することができる。また、
完全長 cDNA を合成するためには、3' 端にオリゴ dT (好ましくは、30~70
個) を連結すればよい。3' 突出末端としてオリゴ dT を有する二 本 鎖 DNA プラ
イマーは、例 え ば 完全長 cDNA ライブライマーを効率良く作製するなどの目的に
30 は特に好ましい。また、cDNA を切り出して他のベクターに組み換えることを容

易にするために、二本鎖 DNA 部分に 8 塩基認識の制限酵素部位を備えることも好ましい。さらにまた、二本鎖 DNA 部分に複製オリジンを備えるようにすることも好ましい。複製オリジンとしては、大腸菌などの原核細胞や、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞、植物細胞などの真核細胞内で機能するものが用いられる。これによって、最終的に得られた cDNA ベクターをこれらの細胞に導入して、複製することが可能となる。さらに、cDNA をインピトロ転写・翻訳により試験管内で発現させたり、真核細胞内に導入して発現させたりできるように、二本鎖 DNA 部分にプロモーター、スプライシング領域、ポリ(A)付加部位などを備えることも好ましい。

10

このような二本鎖 DNA プライマー（第 5 発明）は、適当なベクターDNA を出発材料として適宜にデザインしてもよく、あるいは公知のもの（例えば、pKA1 ベクタープライマー（一端に約 60 個の 3' 突出末端 dT テールを有し、もう一端が EcoRV 平滑末端 [Kato et al., Gene 150:243-250, 1994] ）等を使用することもできる。この発明の二本鎖 DNA プライマーの一般的な構造を図 2 に示した。プライマー配列として 60±10 個の dT を有している。もう一方の末端部は、平滑末端、突出末端いずれでも良い。プライマー配列を含む末端部に 8 塩基認識制限酵素部位 RE1 を有し、もう一方の末端部に 8 塩基認識制限酵素部位 RE2 と 5' 突出末端あるいは平滑末端を生成する制限酵素部位 RE3 を有することが好ましい。8 塩基認識制限酵素部位としては、NotI、Sse8387I、PacI、SwaI、SfiI、SgrAI、AscI、FseI、PmeI、SrfI などが利用できる。この発明において作製した pGCAP1 ベクタープライマーは、RE3 として AfIII 部位 (CTTAAG) を設けてあるが、この AfIII 5' 突出末端 (...CTTAA) に第一鎖 cDNA の 3' 端が連結すると、「キャップ連続 cDNA」の場合、5' 突出末端に「dG」が付加して、...CTTAAG... となり、AfIII の切断認識配列が復活する。したがって、「キャップ連続 cDNA」クローニングは、AfIII によって切断可能となる。このことを利用すれば、AfIII 消化によってキャップ連続 cDNA クローンかどうかを判定することもできる。他にも「dG」付加によって切断認識配列が復活する MunI(CTTAAG)、XhoI(CTCGAG) 等も利用できる。さらに、この発明において作製した pGCAP10 ベクタープライマーは、RE1 として NotI、RE2 として

SwalI、*RE3* として *EcoRI* を有する。

この出願の第 3 発明は、前記第 2 発明の方法によって最終的に作製された cDNA ベクターの集団からなる「cDNA ライブラリー」である。この cDNA ライ
5 ブラリーは、後記実施例にも示したように、キャップ連続 cDNA を含むクローネンを 60%以上、好ましくは 75%以上、さらには 90%以上、最も好ましくは 95%以上という極めて高い確率で保有することを特徴としている。

従って、この第 3 発明の cDNA ライブラリーは、そのほとんどのクローネンが
10 キャップ連続 cDNA であるため、キャップ連続 cDNA を特に選択しない場合であっても、高い確率でキャップ連続 cDNA を単離して解析することができる。
ただし、正確を期すためには、この出願の第 4 発明の方法によって、キャップ連続 cDNA を正しく選択することができる。すなわち、前記第 1 発明および第
15 2 発明の方法によって合成されたキャップ連続 cDNA は、その 5'端に「(dT)ndG」を有することを特徴としているため、全塩基配列を調べる必要はなく、この「(dT)ndG」の存否を指標としてキャップ連続 cDNA を特定することができる。「(dT)ndG」の存在は、公知の塩基配列決定法等により簡便に行うことができる。なお、キャップ連続 cDNA の 90%以上は「dG」から始まるので、
実際的には「dG」の存否を指標とすればよい。

20

この出願の第 6 発明は、この発明の方法で cDNA を合成するために最低限必要とする試薬類、すなわち二本鎖 DNA プライマー、逆転写酵素と反応緩衝液、T4 RNA リガーゼと反応緩衝液、キャップ付加モデル mRNA を含む cDNA 合成用試薬キットである。このキットを用いれば、任意のキャップ付加 mRNA を含む RNA 混合物から、キャップ連続 cDNA を含む cDNA ライブラリーを容易に作製することができる。

実施例

次に実施例により発明を具体的に説明するが、この発明はこれらの例に限定されるものではない。なお DNA の組換えに関する基本的な操作および酵素反応は、文献 (Sambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989) に従った。

- 5 制限酵素および各種修飾酵素は特に記載の無い場合には宝酒造社製のものを用いた。各酵素反応の緩衝液組成、並びに反応条件は付属の説明書に従った。

実施例 1

10 キャップアナログ付加 RNA を用いた cDNA 合成

(1) キャップアナログ付加 RNA の調製

ヒト延長因子-1 α (EF-1 α) の完全長 cDNA クローン pHP00155(非特許文
15 献 6)を NotI 消化により直鎖状にした後、これを鋳型にしてインビトロ転写キット (Ambion 社製) を用いて mRNA を調製した。反応液にキャップアナログとして、m⁷G(5')pppG(5')あるいは A(5')pppG(5') (いずれも Ambion 社製) を添加することにより、「m⁷G」あるいは「A」をキャップ構造とするモデル mRNA 得た。また、キャップアナログ無添加によって、キャップ構造を持たないモ
20 デル mRNA 得た。インビトロ転写産物の 5'端の塩基配列は、ベクター由来の配
列 (5'-GGGAATTCGAGGA-3') の下流に EF-1 α の 5' 端配列 (5'-
CTTTTCGCAA.....) が続いている。

(2) 第一鎖 cDNA 合成

25 上記で調製したモデル mRNA 0.3 μ g と pKA1 ベクタープライマー (一端に約
60 個の 3'突出末端 dT テールを有し、もう一端が EcoRV 平滑末端) (非特許文
献 6) 0.3 μ g を反応液 (50mM Tris-HCl, pH8.3, 75mM KCl, 3mM MgCl₂,
5mM DTT, 1.25mM dNTP) に混合し、モデル mRNA とベクタープライマーと
30 をアニールさせたのち、逆転写酵素 SuperScript™ II (インビトロジエン社
製) 200U トリボヌクレアーゼインヒビター40U (宝酒造社製) を添加して、

42℃1時間反応させ、モデル mRNA に相補的な第一鎖 cDNA を合成した。反応液をエノール抽出した後、エタノール沈澱により、キャップ(+)mRNA/cDNA ヘテロデュプレックスとベクタープライマーの連結体を回収し、水 20μl に溶解した。

5

(3) 脱キャップ反応

キャップ(+)mRNA/cDNA ヘテロデュプレックス溶液 20μl を反応液 (50mM 酢酸ナトリウム, pH5.5, 5mM EDTA, 10mM 2-メルカプトエタノール) に混合し、10U のタバコ酸性ピロホスファターゼ (日本ジーン社製) を添加し、37℃ 10 30 分間反応させ、mRNA のキャップ構造を除去した。反応液をエノール抽出した後、エタノール沈澱により、脱キャップ mRNA/cDNA ヘテロデュプレックスとベクタープライマーの連結体を回収し、水 20μl に溶解した。

(4) セルフライゲーション

15 前記(2)で得たキャップ(+)mRNA/cDNA ヘテロデュプレックス溶液、および前記(3)で得た脱キャップ mRNA/cDNA ヘテロデュプレックス溶液のそれぞれ 20 μl を反応液 (50mM Tris-HCl, pH7.5, 5mM MgCl₂, 10mM 2-メルカプトエタノール, 0.5mM ATP, 2mM DTT) に混合し、120U の T4 RNA リガーゼ (宝酒造社製) を添加し、20℃16 時間反応させ、mRNA/cDNA ヘテロデュプレックスの末端とベクタープライマーの EcoRV 末端とをライゲーションさせて環状とした (セルフライゲーション反応)。反応液をエノール抽出した後、エタノール沈澱により、セルフライゲーション産物を回収し、水 20μl に溶解した。

(5) RNA 鎖から DNA 鎖への置換

25 セルフライゲーション産物溶液 20μl を反応液 (20mM Tris-HCl, pH7.5, 4mM MgCl₂, 10mM (NH₄)₂SO₄, 100mM KCl, 50 μg/ml BSA, 0.1mM dNTP) に混合し、0.3U の RNaseH (宝酒造社製)、4U の E.coli DNA ポリメラーゼ I (宝酒造社製)、60U の E.coli DNA リガーゼ (宝酒造社製) を添加し、12℃5 時間反応させ、RNA 鎖を DNA 鎖で置換して第二鎖 cDNA を合成し、30 cDNA/cDNA デュプレックスをインサートとするベクター (cDNA ベクター)

を得た。反応液をフェノール抽出した後、エタノール沈殿により、cDNA ベクターを回収し、TE 40 μ l に溶解した。

(6) 大腸菌の形質転換

5 cDNA ベクター溶液 1 μ l を DH12S コンピテント細胞（インピトロジエン社
製）20 μ l と混合し、エレクトロポレーション法により形質転換を行なった。エ
レクトロポレーションは、MicroPulser（バイオラッド社製）を用いて行なった。
得られた形質転換体を SOC 培地に懸濁したのち、100 μ g/ml アンピシリン含
有寒天培地上に蒔いて、37°C一晩培養した。その結果、形質転換大腸菌約 10⁵
10 ～10⁶ 個のライブラリーが得られた。

(7) cDNA クローンの 5'端塩基配列解析

寒天培地上に生成したコロニーを拾い、100 μ g/ml アンピシリン含有 LB 培
地に懸濁し、37°C一晩培養した。培養液から菌体を遠心分離した後、アルカリ
15 /SDS 法によりプラスミド DNA を単離・精製した。このプラスミドを鋳型にし
て、キット（BigDye Terminator v3.0、ABI 社製）を用いてサイクルシーケン
シング反応を行ない、蛍光 DNA シーケンサー（ABI 社製）により cDNA の 5'端
塩基配列を決定した。

20 キャップアナログとして m⁷G(5')pppG(5)を用いて作製したモデル mRNA を
鋳型にした場合、cDNA インサートを有する 20 クローン中、キャップ連続
cDNA を含むものは 15 個であった。その中の 12 クローンは、モデル mRNA
には無い「dG」が、また 1 クローンは「dTdG」が、転写開始点の dG の前に余
分に付加していた。他に、余分な「dG」を含まないものが 2 個、mRNA の途中
から始まるキャップ非連続 cDNA が 5 個含まれていた。なお、脱キャップ反応
25 を行なわなくとも、生成する形質転換体の数、キャップ部位から始まる cDNA
の割合、余分な「dG」の付加等は変わらなかった。

一方、キャップアナログとして A(5')pppG(5)を用いて作製したモデル mRNA
を鋳型にした場合、cDNA インサートを有する 24 クローン中、キャップ連続
cDNA を含むものは 18 個であった。その中の 15 クローンは、モデル mRNA
30 には無い「dA」が、また 1 クローンは「dTdA」が、転写開始点の G の前に余

分に付加していた。他に、余分な「dA」を含まないものが2個、mRNAの途中から始まるキャップ非連続cDNAが6個含まれていた。

またいずれの場合にも、キャップ非連続cDNAを有するクローンでは、モデルmRNAには本来無い余分な「dG」や「dA」が付加した物は見出せなかった。

5 さらに、キャップ構造を持たないモデルmRNAを錆型として用いた場合には、cDNAインサートを有する19クローン中、転写開始点からの配列を含むものは16個であった。その中の14クローンは、転写開始点のGの前に余分な配列を持たなかった。しかし、2クローンはモデルmRNAには無い「dT」が余分に転写開始点のGの前に付加していた。他に、mRNAの途中から始まるキャップ非連続cDNAが3個含まれていた。

10 以上の結果から、この発明の方法によって、第一鎖cDNA合成の際にその錆型となるmRNAのキャップ構造塩基「G」に相補的なヌクレオチド「dC」が付加され、第二鎖cDNA合成の際に第一鎖cDNA3'端の「dC」に相補的な「dG」が付加されることが示された。さらに、相補的な「dG」の後に、dTが付加される場合も認められた。従って、cDNAの5'端に「dG」あるいは「dTdG」が付加している場合には、キャップ連続cDNAであることが示唆された。

(8) 突出末端ベクタープライマーを用いたcDNA合成

第一鎖cDNAを合成後、EcoRIでベクタープライマーを切断し、5'突出末端を生成した後、セルフライゲーション反応を行なったところ、平滑末端EcoRVを有するベクタープライマーを用いた場合と同様に5'端に「dG」が付加したキャップ連続cDNAクローンが得られた。従って、pKA1ベクタープライマーの制限酵素切断末端は、平滑末端だけでなく、5'突出末端でも良いことが示された。また、平滑末端の場合に比べライゲーションの効率が高くなりcDNAライブライマーに含まれるクローンの数が多くなった。

実施例2

培養細胞 HT-1080 由来の mRNA を用いた cDNA ライブライマー作製

ヒトフィプロサルコーマ細胞株 HT-1080 (大日本製薬から購入) から AGPC 法 (ニッポンジーン社製キット) を用いて、全 RNA を調製した。これをビオチン化オリゴ(dT)プライマー (プロメガ社製) に結合させ、Streptavidin MagneSphere Particles を加えた後マグネットにかけて、ポリ(A)⁺RNA を精製した。ポリ(A)⁺RNA 0.3 μg と pKA1 ベクタープライマー 0.3 μg を用いて、実施例 1 と同じ条件で cDNA を合成し、大腸菌の形質転換を行ない、cDNA ライブライリーを作製した。その結果、約 10⁵ から 10⁶ の形質転換体を含むライブラリーが得られた。脱キップ反応を行なった場合と、行なわなかった場合の両方でライブラリーを作製したが、両者のライブラリーの解析結果に大きな差異は無かったので、以下に脱キップ反応無しの結果についてのみ記載する。

上記ライブラリーから無作為にコロニーを選択し、プラスミドを単離した後、cDNA の 5' 端の塩基配列を決定した。cDNA インサートを有するもので、その配列が決定できたもの 191 クローンについて、GenBank の核酸データベースを用いて BLAST 検索を行なったところ、189 クローンが mRNA 由来の遺伝子として登録されていた。全体の 94% に当たる 178 クローンは、すべて翻訳領域を含んでいた。含量がもっとも多いのが、リポソーム蛋白質 P1 と延長因子 1-α であり、それぞれ 5 クローンづつ含まれていた。5' 端の塩基配列は、5 クローンすべてが、リポソーム蛋白質 P1 は 5'-GCCCTTCCTCAGCTGCCGC...、延長因子 1-α は 5'-GCTTTTCGCAACGGGTTG... であり、いずれも 5' 端の「dG」以外は、従来方法 (DNA-RNA キメラオリゴキャッピング法) で作製されたライブラリーから得られたもの (非特許文献 6) と同じ配列を有していた。ゲノム配列と比較してみると、5' 端にあるいずれの「dG」も、ゲノム配列には存在しておらず、cDNA 合成の過程で付加したものであることが確認された。このことを裏付けるものとして、翻訳領域を含んでいる 178 クローン中、168 クローンが「dG」から始まるものであった。他に、(dT)n dG (n=1-5) から始まるものが 6 個あった。これらは、「dG」が付加した後、さらに「dT」が複数個付加したものと考えられる。

mRNA 由来の遺伝子として未登録のものも 2 クローン含まれていたが、ゲノム配列の一部と完全に一致し、かつ EST データベースの中に同じ配列を有するものが少数存在していた。いずれもゲノムの配列には存在しない「dG」が付加

した配列であった。したがって、この 2 クローンはまだ遺伝子として未同定の新規完全長 cDNA である可能性が高い。

mRNA の途中から始まるもの（キャップ非連続 cDNA）が、11 クローン含まれていた。これらの cDNA クローンの 5' 端配列が「dG」から始まるものも 3 クローン含まれていたが、いずれも本来の mRNA の配列に由来するものであり、新たに付加した「dG」を有するものは無かった。

以上の結果から、全体としてみると、cDNA インサートを有する 191 クローンの中で、完全長（キャップ連続 cDNA）であると思われるものが 180 クローン含まれていることから、完全長率は 94% という値になる。また、5' 端配列が「dG」から始まる 171 クローンの中で、キャップ非連続 cDNA は 3 クローンであったことから、この cDNA ライブラリーの場合、5' 端配列が「dG」で始まるものでかつ翻訳領域を含んでいるものは、完全長 cDNA であることが 98% の確率で保証されていると言える。特に、ゲノムの配列には存在しない「dG」から始まるものは、ほぼ間違いなく完全長 cDNA であることが保証される。

15

実施例 3

培養細胞 HT-1080 由来の全 RNA を用いた cDNA ライブラリー作製

ヒトフィプロサルコーマ細胞株 HT-1080 から実施例 2 で調製した全 RNA 5 μ g と pKA1 ベクタープライマー 0.3 μ g を用いて、実施例 1 と同じ条件（ただし、脱キャップ反応は省略）で cDNA を合成し、大腸菌の形質転換を行ない、cDNA ライブラリーを作製した。その結果、約 10^5 の形質転換体を含むライブラリーが得られた。

このライブラリーに含まれる cDNA クローンについて、実施例 2 と同様に 5' 端の部分塩基配列解析を行なった。cDNA インサートを有するもので、その配列が決定できたもの 222 クローンについて、GenBank の核酸データベースを用いて BLAST 検索を行なったところ、217 クローンが mRNA 由来の遺伝子として登録されていた。全体の 96% に当たる 209 クローンは、すべて翻訳領域を含んでいた。これらの中で、189 クローンは「dG」から始まるクローンであった。

ここで特筆すべき点は、このライブラリーは、精製したポリ(A)⁺RNA からではなく、全 RNA から作製したという点である。しかも、その量は 5 μg という微量である。したがって、この方法を用いることにより、ポリ(A)⁺RNA の精製プロセスを省くことができ、かつ数 μg オーダーの全 RNA から高品質の完全長
5 cDNA ライブラリーを作製できることが示された。

実施例 4

培養細胞 ARPE-19 完全長 cDNA ライブラリーの大規模配列解析

10

ヒト網膜色素上皮細胞株 ARPE-19 (ATCC から分譲) から調製したポリ(A)⁺RNA 2.5 μg と pKA1 ベクタープライマー 0.7 μg を用いて、実施例 1 と同じ条件で cDNA を合成し、大腸菌の形質転換を行ない、cDNA ライブラリーを作製した。このライブラリーに含まれる cDNA クローンについて、実施例 2 と同
15 様に 5'端の部分塩基配列解析を行なった。cDNA インサートを有するもので、その配列が決定できたもの 3,683 クローンについて、GenBank の核酸データベースを用いて BLAST 検索を行なったところ、3,662 クローンが mRNA 由来の遺伝子として登録されていた。全体の 94% に当たる 3,474 クローンは、完全長
cDNA クローンであった。これらの中で、3,069 クローンは「dG」あるいは
20 「(dT)ndG」から始まるクローンであった。

実施例 5

pGCAP1 ベクタープライマーの作製

25

多機能クローニングベクター pKA1 (非特許文献 6) を出発材料にして、pGCAP1 を作製した。図 3A にその構造の模式図を、配列表の配列番号 1 にその全塩基配列を示す。pKA1 との相違点は、(1)複製オリジンを pUC19 由来に変えたこと、(2)pKA1 の制限酵素部位 HindIII の上流に PacI を追加したこと、
30 (3)pKA1 の EcoRI-BstXI-EcoRV-KpnI 部位を EcoRI-AfIII-SwaI-KpnI に置換し

たことである。配列番号 1 の 1 番目ヌクレオチド「A」は *Hind*III 部位に、また 568 番目が *Eco*RI 部位に対応する。

pGCAP1 100 μ g を 200U の *Kpn*I で完全消化後、0.8%アガロース電気泳動にかけ、切断片を単離精製した。得られた切断片 70 μ g を 20 μ M dTTP 存在下、5 375U の末端転移酵素（宝酒造社製）を添加し、37°C 30 分間反応させ、*Kpn*I 消化によって生成した 3'突出末端に約 60 個の dT テールを付加した。次いで反応生成物を *Swa*I で消化し、0.8%アガロース電気泳動にかけ、長い方の切断片を単離精製した。これを pGCAP1 ベクタープライマー（図 3B）として用いた。

10

実施例 6

pGCAP1 ベクタープライマーを用いた cDNA ライブライリー作製

ヒトフィプロサルコーマ細胞株 HT-1080 の全 RNA 5 μ g と実施例 5 で調製した pGCAP1 ベクタープライマー 0.3 μ g を用いて、実施例 3 と同じ条件で cDNA を合成し、大腸菌の形質転換を行ない、cDNA ライブライリーを作製した。その結果、約 2×10^5 の形質転換体を含むライブライリーが得られた。このライブライリーに含まれる cDNA クローンについて、5'端の部分塩基配列解析を行なったところ、5'端に「dG」が付加した完全長 cDNA が得られ、実施例 3 と同様に完全長率は 95% であった。

pKA1 ベクタープライマーを用いた場合、*Eco*RV 切断末端 (...GAT) に G が一個付加すると...GATG...となり開始コドン ATG が新たに生成する。このことは、キャップ連続 cDNA の配列を知ることが目的の場合は問題にならないが、このベクターを発現ベクターとして用いようとする場合は、余分な ATG の存在 25 は cDNA の正確な転写・翻訳に悪影響を及ぼす可能性がある。pGCAP1 ベクタープライマーを用いると、*Swa*I 切断末端 (...ATT) に G が一個付加すると ...ATTG... となり開始コドンは生成しないので、この問題は生じない。

さらに、第一鎖 cDNA を合成後、*Af*III でベクタープライマーを切断し、5'突出末端を生成した後、セルフライゲーション反応を行なったところ、平滑末端 30 *Swa*I を有するベクタープライマーを用いた場合と同様に 5'端に「dG」が付加

したキャップ連続 cDNA クローンが得られた。 *Af*III 切断末端 (...CTTAA) に G が一個付加すると...CTTAAG...となり、*Af*III 切断部位の再形成が起こる。したがって、キャップ連続 cDNA クローンは、*Af*III によって切断可能となる。このことを利用すれば、*Af*III 消化によってキャップ連続 cDNA クローンかどうかを 5 判定することもできる。

実施例 7

培養細胞 ARPE-19 完全長 cDNA ライブラリーの発現プロフィール解析

10

ヒト網膜色素上皮細胞株 ARPE-19 の全 RNA 5 μg から、実施例 4 と同様にして cDNA ライブラリーを作製し、5'端の部分塩基配列解析を行なった。cDNA インサートを有するもので、その配列が決定できたもの 3,204 クローンについて、GenBank の核酸データベースを用いて BLAST 検索を行なったところ、全体の 15 95% に当たる 3,038 クローンは、完全長 cDNA クローンであった。

これらの完全長 cDNA クローンのインサートのサイズ分布を調べてみたところ、最も短いものは 0.1 kbp、最も長いものは 10 kbp と広範囲の長さのインサートを有しており、平均鎖長は 1.94 kbp であった。3 kbp 以上の長鎖クローンも 16% を占めていた。

これらのクローンを分類したところ、1,408 種類の遺伝子からなることが示された。最も多く含まれているのはグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ cDNA であり、44 クローン（全クローンの 1.4%）含まれていた。3 クローン以上、すなわち 0.1% 以上の発現量を示すものは 235 種類の cDNA に留まり、971 種類（全遺伝子の 69%）の cDNA は 1 クローンづつしかとれず、25 0.03% 以下の低い発現量の遺伝子であることが示された。また、ゲノム配列には一致するが、データベースにまだ遺伝子として登録されていない非常に発現量の少ないと思われる新規遺伝子クローンも含まれていた。このように、得られた cDNA ライブラリーは、発現量の低い遺伝子をも数多く含み、冗長度の低い高品質のライブラリーであることが確認された。

30 以上の解析の結果、この発明の方法で作製した cDNA ライブラリーは、完全

長 cDNA クローンの含有率が高いだけでなく、遺伝子の鎖長や発現量によるバイアスがかからずに、細胞内で発現している mRNA の発現量を忠実に反映していることが示唆された。したがって、この方法は完全長 cDNA クローンを取得する目的だけでなく、細胞内で発現している遺伝子の発現プロフィールを解析するためにも有効である。

実施例 8

pGCAP10 ベクタープライマーの作製とこれを用いた cDNA ライブライリー作製

10

pGCAP1 を出発材料にして、pGCAP10 を作製した。図 4A にその構造の模式図を、配列表の配列番号 2 にその全塩基配列を示す。pGCAP1 との相違点は、EcoRI-AfIII-SwaI-KpnI 部位を SwaI-EcoRI-FseI-EcoRV-KpnI に置換したことである。実施例 5 と同様にして pGCAP10 の KpnI 3' 突出末端に約 60 個の dT テールを付加した。次いで反応生成物を EcoRV で消化し、長い方の切断片を pGCAP10 ベクタープライマー（図 4B）として用いた。このベクタープライマー 0.3 μg とヒトフィブロサルコーマ細胞株 HT-1080 の全 RNA 5 μg を用いて、実施例 3 と同じ条件で第一鎖 cDNA を合成したのち、EcoRI 消化によってベクター側の末端を 5' 突出末端とした。セルフライゲーションを行なった後、mRNA 鎮を DNA 鎮に置換する工程を省いて大腸菌の形質転換を行ない、cDNA ライブライリーを作製したところ、約 10⁶ の形質転換体を含むライブライリーが得られた。このライブライリーに含まれる cDNA クローンについて、5' 端の部分塩基配列解析を行なったところ、5' 端に「dG」が付加した完全長 cDNA が得られ、実施例 3 と同様に完全長率は 95% であった。

25

産業上の利用可能性

以上詳しく述べたとおり、この出願の発明によって、1 μg オーダーの全 RNA から、PCR を使用せずに、少ない工程で、転写開始点ヌクレオチドからの

連続配列を有することが保証された完全長 cDNA を、90%以上の高収率で合成することが可能となる。これによって遺伝子がコードしている蛋白質の一次構造に関する情報と、遺伝子の発現を調節している発現制御領域に関する情報を確実に得ることが可能となり、ゲノム情報を有効に活用できるばかりか、医療分野等
5 における有用蛋白質の遺伝子工学的製造にも大きく貢献する。

請求の範囲

1. mRNA のキャップ構造に隣接するヌクレオチドからの連続配列を有する cDNA を合成する方法であって、
 - 5 (i) キャップ構造を有する mRNA を含む RNA 混合物に、二本鎖 DNA プライマーをアニールする工程、(ii) 二本鎖 DNA プライマーから逆転写酵素により第一鎖 cDNA を合成して mRNA/cDNA ヘテロデュプレックスと二本鎖 DNA プライマーの連結体を調製する工程、および
 - 10 (iii) mRNA/cDNA ヘテロデュプレックスと二本鎖 DNA プライマーの連結体の cDNA を含む DNA 鎖の 3'端と 5'端を、リガーゼを用いて連結し環状化する工程、を含むことを特徴とする方法。
- 15 2. キャップ構造を有する mRNA が細胞抽出物中に含まれている請求項 1 の方法。
3. キャップ構造を有する mRNA がインビトロ転写によって合成されたものである請求項 1 の方法。
- 20 4. 二本鎖 DNA プライマーのプライマー配列が、キャップ構造を有する mRNA の部分配列に相補的な配列を含む請求項 1 の方法。
5. 二本鎖 DNA プライマーのプライマー配列が、キャップ構造を有する 25 mRNA のポリ(A)配列に相補的なオリゴ dT を含む請求項 1 の方法。
6. リガーゼが T4 RNA リガーゼである請求項 1 の方法。
7. 工程(ii)と工程(iii)の間に、以下の工程：
 - 30 (ii') mRNA/cDNA ヘテロデュプレックスと二本鎖 DNA プライマーの連結体を

制限酵素で切斷することにより、二本鎖 DNA プライマーの端部に 5'突出末端あるいは平滑末端を生成する工程、
を含む請求項 1 から 6 のいずれかの方法。

5 8. さらに以下の工程：

(iv) mRNA/cDNA ヘテロデュプレックスと二本鎖 DNA プライマーの連結体の RNA 鎌を DNA 鎌に置換して第二鎖 cDNA を合成する工程、
を含む請求項 1 から 7 のいずれかの方法。

10 9. 二本鎖 DNA プライマーが複製オリジン、または複製オリジンと cDNA 発現用プロモーターを含んでいる請求項 8 の方法。

10. さらに以下の工程：

(v) 第一鎖 cDNA と第二鎖 cDNA とからなる二本鎖 cDNA をベクターDNA の一部とする工程、
を含む請求項 8 の方法。

11. 請求項 8 または請求項 10 の方法によって合成された二本鎖 cDNA を含むクローンの集団であって、5'端にヌクレオチド(dT)_n dG (n=0~5) を有し、
これに連続して mRNA のキャップ構造に隣接するヌクレオチドからの連續配列
を有する cDNA のクローンを 60%以上含むことを特徴とする cDNA ライブライ
ー。

12. 請求項 11 の cDNA ライブライーのクローンから、mRNA のキャップ構
造に隣接するヌクレオチドからの連續配列を有する cDNA のクローンを選択す
る方法であって、5'端ヌクレオチドが(dT)_n dG (n=0~5) である cDNA を含
むクローンを目的クローンとする方法。

13. プライマー部分がオリゴ (dT) n (n=15~100) からなり、プライマー
側の末端部分に 8 塩基認識制限酵素切断部位 RE1 を有し、もう一方の末端部に

8 塩基認識制限酵素切断部位 RE2 と 5'突出末端あるいは平滑末端を生成する制限酵素部位 RE3 を有する二本鎖 DNA プライマー。

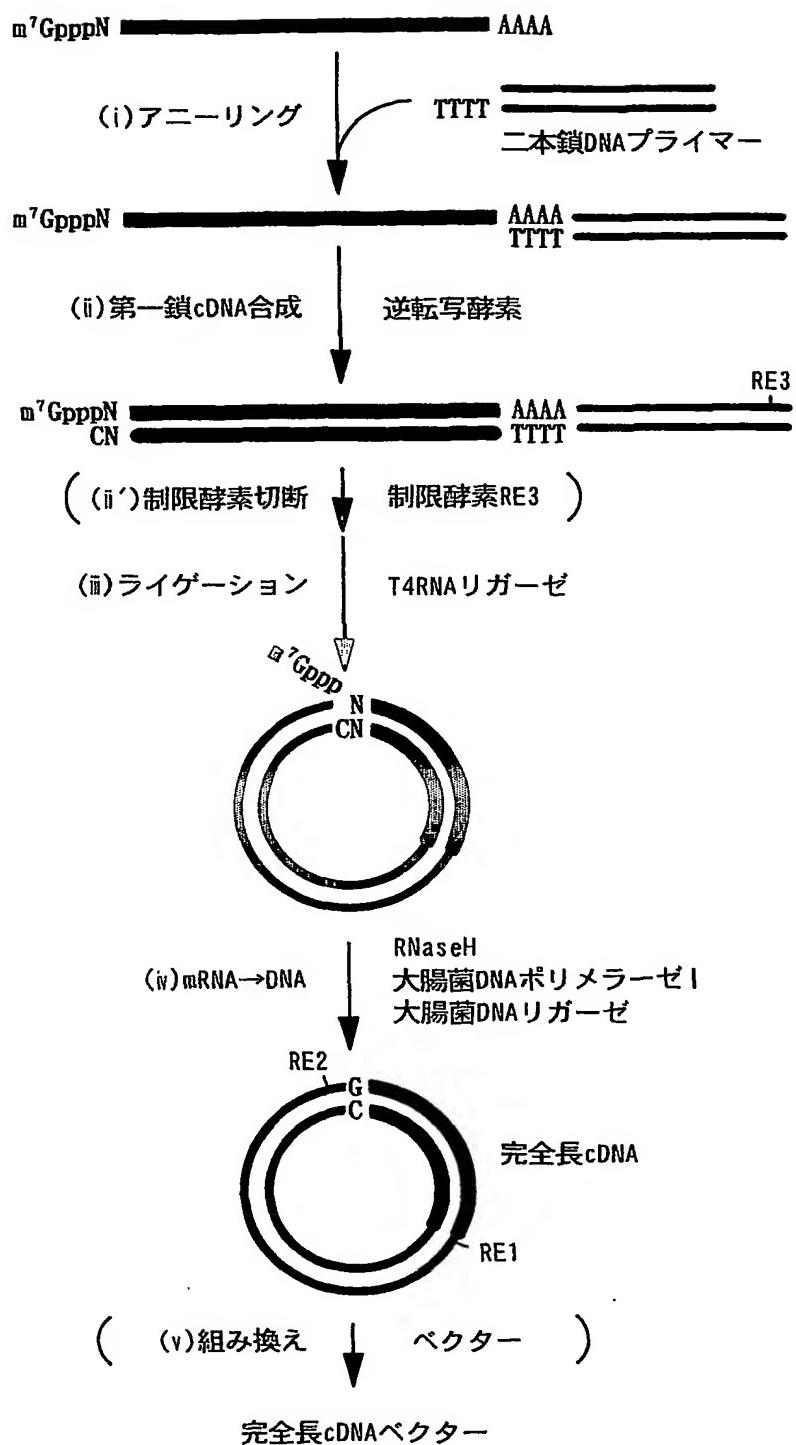
14. 複製オリジン、または複製オリジンと cDNA 発現用プロモーターを含ん
5 でいる請求項 13 の二本鎖 DNA プライマー。

15. 配列番号 2 の塩基配列を有する pGCAP10 由来のベクタープライマーで
ある請求項 14 の二本鎖 DNA プライマー。

10 16. 請求項 14 あるいは請求項 15 の二本鎖 DNA プライマー、逆転写酵素と
反応緩衝液、T4 RNA リガーゼと反応緩衝液、キャップ付加モデル mRNA を含
む cDNA 合成用試薬キット。

1/4

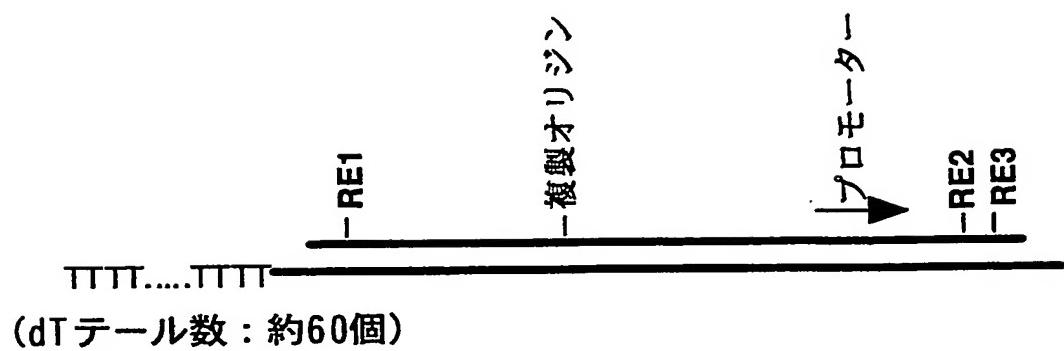
図 1



差替え用紙(規則26)

2/4

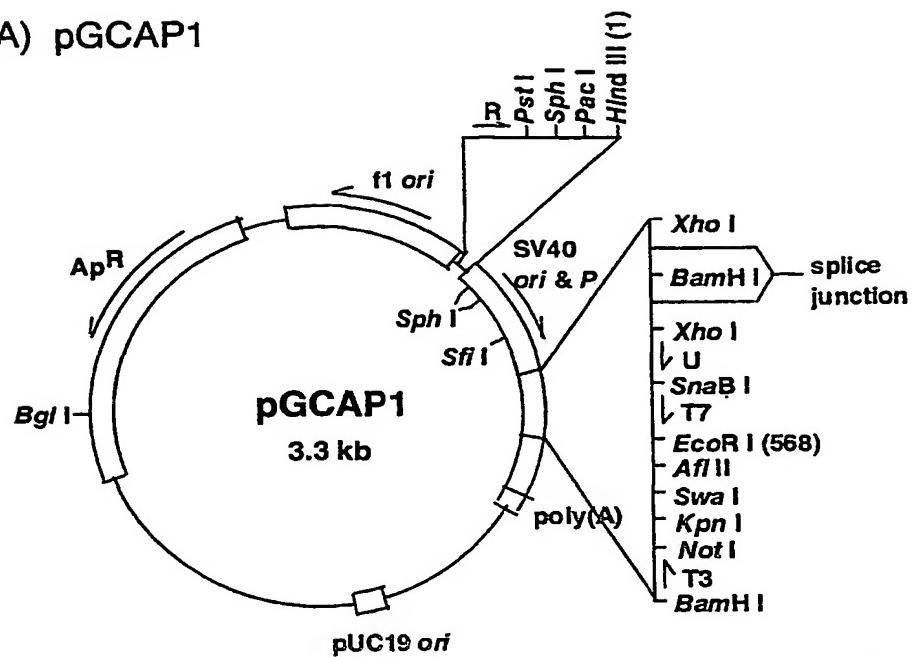
図 2



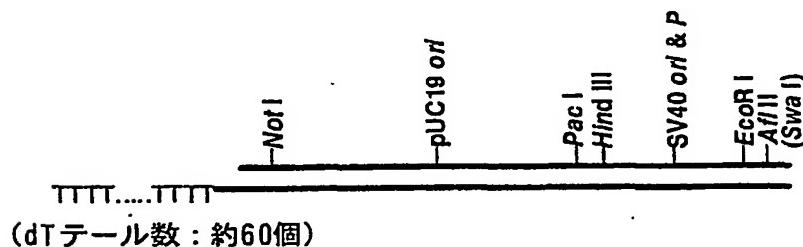
3/4

図 3

(A) pGCAP1



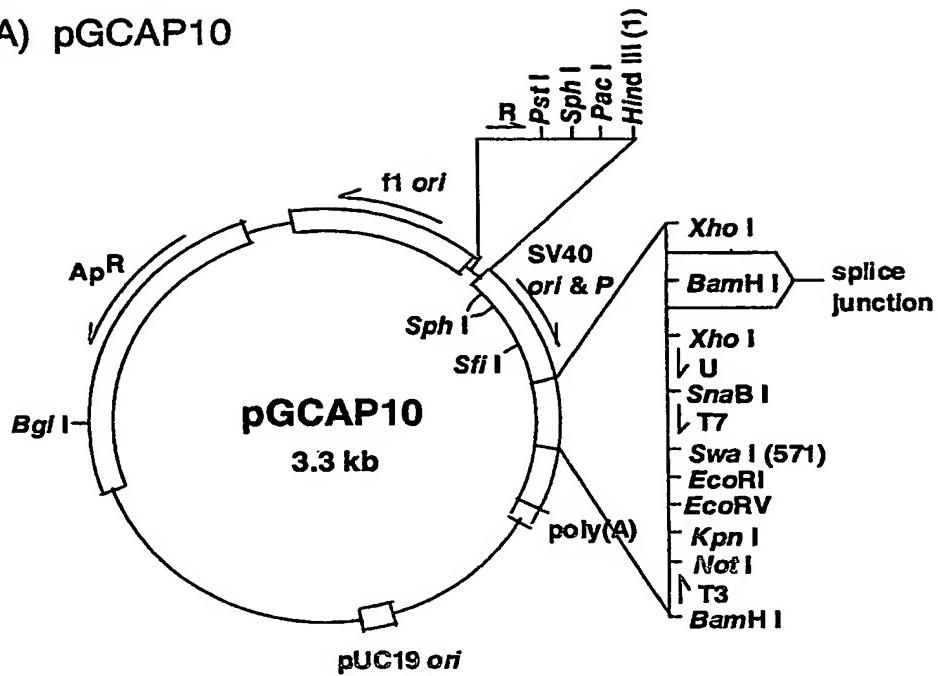
(B) pGCAP1ベクタープライマー



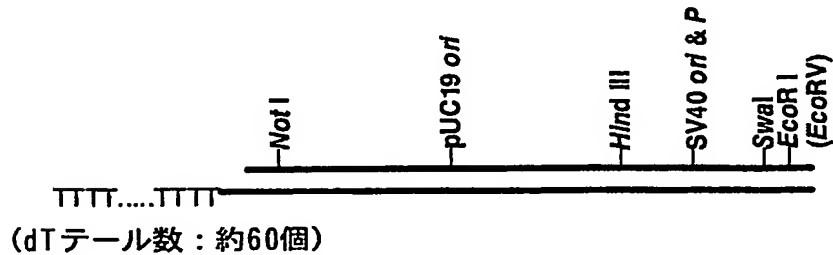
4/4

図 4

(A) pGCAP10



(B) pGCAP10ベクタープライマー



SEQUENCE LISTING

<110> President of National Rehabilitation Center for Persons with Disabilities
Hitachi Instruments Service Co., Lt.
KATO, Seishi

<120> Method for synthesizing cDNA

<130>

<150> JP2003-91373

<151> 2003-03-28

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3347

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pGCAP1: Modified from expression vector pKA1

<220>

<221> misc_feature

<223> Circular polynucleotide

<400> 1

aagcttggct gtggaatgtg tgcgttag ggtgtggaaa gtcggccaggc tccccagcag	60
gcagaagtat gcaaaggcatg catctcaatt agtcagcaac cagggtgtgaa aagtccccag	120
gctcccccaggc aggccagaagt atgcaaagca tgcatctcaa tttagtcagca accatagtcc	180
cggcccttaac tccggccatc ccggccctaa ctccggccagg ttcggccat tctccggcccc	240
atggctgact aattttttt atttatgcag aggccgaggc cgcctcgcc tctgagctat	300
tccagaagta gtgaggaggc tttttggag gcctaggctt ttgcaaaaag ctccctcgagg	360.
aactgaaaaa ccagaaagtt aactggtaag tttagtcttt ttgtctttt tttcagggtcc	420
cggtccgggt ggtggtgcaa atcaaagaac tgctccctcag tggatgttgc ctttacttct	480
aggcctgtac ggaagtgtta ctctgtctt aaaagctgct cgagtgtaaa acgacggcca	540
gtacgtattt aatacgactc actataggga attcccttaag atttaaatgt ggtaccgcgg	600
ccgcggatct ccctttagtg agggttaatt ggatccagac atgataagat acattgatga	660
gtttggacaa accacaacta gaatgcagtg aaaaaaaaaatgc ttatattgtg aaatttgta	720
tgctattgtct ttatattgtaa ccattataag ctgcaataaaa caagttaca acaacaatttg	780
cattcattttt atgtttcagg ttcaaggggga ggtgtggag gtttttctg cattaatgaa	840
tcggccaaacg cgcggggaga ggcgggttgc gtattggcgc ctctccgc tcctcgctca	900

ctgactcgct	gcgctcggtc	gttcggctgc	ggcgagcggt	atcagctcac	tcaaaggcgg	960
taatacggtt	atccacagaa	tcaggggata	acgcaggaaa	gaacatgtga	gcaaaaggcc	1020
agcaaaaggc	caggaaccgt	aaaaaggccg	cgttgcgtgc	gttttccat	aggctccgcc	1080
ccccgtacga	gcatcacaaa	aatcgacgct	caagtacagag	gtggcgaaac	ccgacaggac	1140
tataaaagata	ccagggcgaaa	ccccctggaa	gctccctcg	gcgctctcct	gttccgaccc	1200
tgccgcgtac	cggataacctg	tccgccttcc	tccctcggg	aagcgtggcg	cttctcata	1260
gctcagcgtg	taggtatctc	agttcggtgt	aggtcggtcg	ctccaagctg	ggctgtgtgc	1320
acgaacccc	cgttcagccc	gaccgctcg	ccatatccgg	taactatcg	cttgagtc	1380
acccggtaag	acacgactta	tcgccactgg	cagcagccac	tggttaacagg	attagcagag	1440
cgaggtatgt	aggcggtgct	acagagttct	tgaagtggtg	gcctaactac	ggctacacta	1500
gaaggacagt	attttgtatc	tgcgctctgc	tgaagccagt	tacccitcgga	aaaagagttg	1560
gtagctcttg	atccggcaaa	caaaccaccc	ctggtagcgg	tgtttttttt	gttgcaga	1620
agcagattac	gcfgcagaaaa	aaaggatctc	aagaagatcc	tttgcgtttt	tctacgggt	1680
ctgacgctca	gtggAACGAA	aactcacgtt	aagggatttt	ggtcatgaga	ttatcaaaaa	1740
ggatcttac	ctagatcctt	ttaattaaa	aatgaagttt	taaatcaatc	taaagtatat	1800
atagtagtaaa	ttggcttgac	agttaccaat	gcttaatcg	tgaggcacct	atctcagcga	1860
tctgtctatt	tcgttcatcc	atagttgcct	gactccccgt	cgtgtagata	actacgatac	1920
gggagggctt	accatctggc	cccagtgc	caatgatacc	gcfgagaccca	cgctcaccgg	1980
ctccagatit	atcagcaata	aaccagccag	ccggaagggc	cgagcgcaga	agtggctcg	2040
caactttatc	cgccctccatc	cagtctat	attgttgccg	ggaagctaga	gtaagtatgtt	2100
cgccagttaa	tagttgcgc	aacgttgc	ccattgc	aggcatcg	gtgtcacgct	2160
cgtcgtttgg	tatggcttca	tccagctcc	gttcccaacg	atcaaggcga	gttacatgtat	2220
cccccatgtt	gtgcaaaaaa	gcggtagt	ccttcgttcc	tccgatcg	gtcagaagta	2280
agttggccgc	agtgttatca	ctcatggta	tggcagca	gcataattct	cttactgtca	2340
tgccatccgt	aagatcttt	tctgtgactg	gtgagactc	aaccaagtca	ttctgagaat	2400
agtgtatgcg	gcgaccgagt	tgctcttgcc	cgccgtcaat	acgggataat	accgcgccac	2460
atagcagaac	tttaaaagt	ctcatcat	gaaaacgtt	ttcggggcga	aaactctaa	2520
ggatcttacc	gctgttgaga	tccagttcga	tgttaacccac	tctgcaccc	aactgatctt	2580
cagcatctt	tacttacc	agcgttgc	ggtgagcaaa	aacaggaagg	caaaatgc	2640
aaaaaaagg	aataaggcgc	acacggaaat	gttgaatact	catactctt	cttttcaat	2700
attattgtt	cattatcag	gttattgtc	tcatgagcgg	atacatattt	aatgtattt	2760
aaaaaaataa	acaataggg	gttccgcgc	catttcccc	aaaagtgc	cctgaaattt	2820
taaacgttta	tattttgtt	aaattcg	taaattttt	ttaatcag	tcatttttt	2880
accaataggc	cgaaatcg	aaaatcc	ataatcaaa	agaatagacc	gagatagggt	2940
tgagtgttgt	tccagttgg	aacaagatc	cactat	gaacgtggac	tccaaacgt	3000
agggcggaaa	aaccgtctat	cagggcgat	gcccactac	tgaaccatca	ccctaata	3060
gttttttggg	gtcgagg	gtc	cgtaaagc	taaattcg	ccctaaagg	3120
ttagagcttgc	acggggaaag	ccggcgaac	tggcgagaaa	ggaaggaaag	aaagcgaag	3180
gagcggggcgc	tagggcg	gtca	gttgc	cggtcac	gcfgtaacc	3240
ccgcgcctaa	tgcggcg	caggcg	cccattcg	attcacac	gaaacagct	3300
tgaccatgtat	cctctag	cgac	ctgc	gcat	gtttaagg	3347

<210> 2

<211> 3357

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> pGCAP10: Modified from pGCAP1 of SEQ ID No. 1

<220>

<221> misc_feature

<223> Circular polynucleotide

<400> 2

aagcttggct	gtggaatgtg	tgtcagttag	ggtgtggaaa	gtccccaggc	tccccagcag	60
gcagaagtat	gcaaaggcatg	catctcaatt	agtcaac	cagggtgtgga	aagtccccag	120
gctcccccagc	aggcagaagt	atgcaaagca	tgcatacaa	tttgtcagca	accatagtcc	180
cgcggccatac	tccgcccatac	ccggccctaa	ctccggccag	ttccggccat	tctccggccc	240
atggctgact	aattttttt	atttatgcag	aggccgaggc	cgcctcgccc	tctgagttat	300
tccagaagta	gtgaggaggc	tttttggag	gcctaggctt	tttgcaaaaag	cgcctcgagg	360
aactgaaaaa	ccagaaaagtt	aactggtaag	tttagtcctt	tttgtcttta	tttcaggtcc	420
cggatccgg	ggtgttgcaa	atcaaagaac	tgctcctcag	tggatgttgc	ctttaacttct	480
aggcctgtac	ggaagtgtta	cttctgctct	aaaagctgct	cgtgtaaa	acgacggcca	540
gtacgtattt	aatacgactc	actataggga	atttaaatga	attcggccgg	ccgatatcct	600
ggtaccgcgg	ccgcggatct	cccttttagtg	agggttaatt	ggatccagac	atgataagat	660
acattgtat	gtttggacaa	accacaacta	aatgcagt	aaaaaaatgc	tttatttg	720
aaatttgtga	tgctattgct	ttatttgtaa	ccattataag	ctgcaataaa	caagttaca	780
acaacaattt	cattcatttt	atgtttcagg	ttcaggggga	ggtgtggag	gtttttctg	840
cattaatgaa	tcggccaacg	cgcggggaga	ggcggttgc	gtattggcg	ctcttcgc	900
tccctcgctc	ctgactcgct	gchgctcggtc	gttcggctgc	ggcgagcggt	atcagctcac	960
tcaaaggcgg	taatacggtt	atccacagaa	tcagggata	acgcaggaaa	gaacatgtga	1020
gcaaaaggcc	agcaaaaggc	caggaaccgt	aaaaaggccg	cgttgcgtgc	gtttttccat	1080
aggctccgcc	cccctgacga	gcatcacaaa	aatcgacgt	caagtcaag	gtggcggaaac	1140
ccgacaggac	tataaagata	ccaggcggtt	ccccctggaa	gctccctcggt	gchgctc	1200
gttccgaccc	tgccgcttac	cggataacctg	tccgccttc	tcccttcggg	aagcgtggcg	1260
cttctcata	gctcacgctg	taggtatctc	agttcggtgt	aggtcggtc	ctccaagctg	1320
ggctgtgtgc	acgaaccccc	cgttcagccc	gaccgctgcg	ccttacccgg	taactatcg	1380
ctttagtcca	acccggtaag	acacgactt	tcgcccactgg	cagcagccac	tggtaacagg	1440
attagcagag	cgaggtatgt	aggcggtgt	acagagtct	tgaagtggtg	gcctaactac	1500
ggctacacta	gaaggacagt	atttggtattc	tgcgcgtc	tgaagccagt	tacccgg	1560
aaaagagttt	gtagctttt	atccggcaaa	caaaccaccc	ctggtagcgg	tggtttttt	1620
gttttgcaga	agcagattac	gcccggaaaa	aaaggatctc	aagaagatcc	tttgcattt	1680
tctacgggt	ctgacgc	gtggAACGAA	aactcacgtt	aagggtttt	ggtcatgaga	1740
ttatcaaaaa	ggatcttac	ctagatcctt	ttaaattaaa	aatgaagttt	taaatcaatc	1800
taaagtata	atgatataac	tttgtctgac	agttaccaat	gcttaatcag	tgaggcacct	1860
atctcagcga	tctgttattt	tcgttcatcc	atagtgcct	gactcccggt	cgtgtagata	1920
actacgatac	gggaggggctt	accatctggc	cccagtgc	caatgatacc	gcgagaccca	1980
cgctcacccg	ctccagattt	atcagcaata	aaccagccag	ccggaaaggc	cgagcgcaga	2040

agtggtcctg caacttatac cgcccccattc cagtcttatta attgttgcgg ggaagctaga	2100
gtaagtagtt cgccaggtaa tagtttgcgc aacgttgttgc ccatggctac aggcatcggt	2160
gtgtcacgtc cgtcggttgg tatggcttca ttcatgttcc gttcccaacg atcaaggcga	2220
gttacatgtat cccccatgtt gtgcaaaaaaa gcggtagt ccttcgggtcc tccgatcggt	2280
gtcagaagta agttggccgc agtgttatca ctcatggta tggcagcact gcataattct	2340
cttactgtca tgccatccgt aagatgtttt tctgtgactg gtgagtgactc aaccaagtca	2400
ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cgccgtcaat acgggataat	2460
accgcgccac atagcagaac tttaaaaagtgt ctcatcattt gaaaacgttc ttccggcga	2520
aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tctaaccac tcgtgcaccc	2580
aactgatctt cagcatcttt tactttacc accgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg	2640
caaaaatgcg caaaaaaggaa aataagggcg acacggaaat gtgaataact catactttc	2700
ctttttcaat attattgaag catttatca ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt	2760
gaatgtattt agaaaaataaa acaaataagg gttccgcgc aattttcccg aaaagtgcgc	2820
cctgaaatgt taaacgttta tattttgtta aaatttcgcgt taaattttg tttaatcagc	2880
tcatttttta accaataggc cgaaatcgcc aaaatccctt ataaatcaaa agaatagacc	2940
gagataggggt tgagtgttgt tccagtttgg aacaagagtc cactattaaa gaacgtggac	3000
tccaacgtca aaggcgaaa aaccgtctat cagggcgatg gcccaactacg tgaaccatca	3060
ccctaatacaa gtttttggg gtcgagggtgc cgtaaagcac taaatcgaa ccctaagg	3120
agcccccgat tttagagcttgc acggggaaag ccggcgacg tggcgagaaa ggaaggaaag	3180
aaagcgaaag gagcggcgcc tagggcgctg gcaagtgttag cggtcacgtc gcgcgttaacc	3240
accacaccccg ccgcgtttaa tgcgcccgtt cagggcgctg cccattcgcc attcacacag	3300
gaaacagcta tgaccatgtat cctctagagt cgacctgcag gcatgcttaa ttaaggg	3357

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004458

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00-90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JICST FILE (JOIS), EUROPAT (QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	H. OKAYAMA, et al., High-Efficiency Cloning of Full-Length cDNA, Molecular and Cellular Biology, 1982, 2(2), p.161-70	1-6,8-10
X	S.C. PRUITT, Expressin vectors permitting cDNA cloning and enrichment for specific sequences by hybridization/seleciton, Gene, 1988, 66, p.121-34	1-6,8-10
A	S. KATO, et al., Construction of a human full-length cDNA bank, Gene, 1994, 150, p.243-50	1-16
A	JP 06-153953 A (The Kanagawa Academy of Science), 03 June, 1994 (03.06.94), & WO 1994/008001 A1 & EP 0625572 A1 & US 5597713 A	1-16

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 April, 2004 (26.04.04)Date of mailing of the international search report
18 May, 2004 (18.05.04)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2004/004458
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5962272 A (CLONTECH LABORATORIES, INC.), 05 October, 1999 (05.10.99), & WO 1997/024455 A2 & JP 2000-502905 A	1-16
A	WO 2001/004286 A1 (Helix Research Institute), 18 January, 2001 (18.01.01), & EP 1195434 A1	1-16
A	US 6022715 A (GENSET, S.A.), 08 February, 2000 (08.02.00), & WO 1996/034981 A2 & JP 11-510364 A	1-16
A	JP 2002-253237 A (The Institute of Physical and Chemical Research), 10 September, 2002 (10.09.02), & US 2002/0106666 A1 & EP 1197552 A2	1-16
A	J. EDWARDS, et al., Oligodeoxyribonucleotide ligation to single-stranded cDNAs: a new tool for cloning 5' ends of mRNAs and for constructing cDNA libraries by in vitro amplification, Nucleic Acids Research, 1991, 19(19), p.5227-32	1-16
A	K. MARUYAMA, et al., Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides, Gene, 1994, 138, p.171-4	1-16
A	I. EDERY, et al., An Efficient Strategy to Isolate Full-Length cDNAs Based on an mRNA Cap Retention Procedure (CAPture), Molecular and Cellular Biology, 1995, 15(6), p.3363-71	1-16
A	P. CARNINCI, et al., High-Efficiency Full-Length cDNA Cloning by Biotinylated CAP Trapper, GENOMICS, 1996, 37, p.327-36	1-16
A	Y. SUZUKI, et al., Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end-enriched cDNA library, Gene, 1997, 200, p.149-56	1-16
A	S. SEKINE, et al., Synthesis of full-length cDNA using DNA-capped mRNA, Nucleic Acids Symposium Series, 1993, No.29, p.143-4	1-16
A	Sumio KANNO, "Kanzencho cDNA Gijutsu", BIO INDUSTRY, 1999, 16(11), p.19-26	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004458

Claims 1 to 16

Considering that the inventions according to claims 1 to 16 relate to methods of synthesizing a cDNA not only from an mRNA having the cap structure but also from an mRNA free from the cap structure (for example, an mRNA lacking the 5'-end), it is unknown how to achieve the synthesis of a full-length cDNA at a high ratio, i.e., how to obtain a full-length cDNA at a high ratio compared with, for example, the oligo-capping method reported in the following documents. Such being the case, it does not appear that the inventions according to the above claims are fully supported by the description or disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete for the invention to be carried out by a person skilled in the art.

1. K. MARUYAMA, et al., Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides, Gene, 1994, 138, p.171-4
2. S. KATO, et al., Construction of a human full-length cDNA bank, Gene, 1994, 150, p.243-50
3. Y. SUZUKI, et al., Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end-enriched cDNA library, Gene, 1997, 200, p.149-56

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl' C12N 15/09

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl' C12N 15/00-90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
JICSTファイル(JOIS), EUROPAT(QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	H. OKAYAMA, et al., High-Efficiency Cloning of Full-Length cDNA, Molecular and Cellular Biology, 1982, 2 (2), p. 161-70	1-6, 8-10
X	S. C. PRUITT, Expressin vectors permitting cDNA cloning and enrichment for specific sequences by hybridization/seleciton, Gene, 1988, 66, p. 121-34	1-6, 8-10
A	S. KATO, et al., Construction of a human full-length cDNA bank, Gene, 1994, 150, p. 243-50	1-16

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.04.2004

国際調査報告の発送日 18.5.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

阪野 誠司

4 N 9286

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 06-153953 A (財団法人神奈川科学技術アカデミー) 1994.06.03 & WO 1994/008001 A1 & EP 0625572 A1 & US 5597713 A	1-16
A	US 5962272 A (CLONTECH LABORATORIES, INC.) 1999.10.05 & WO 1997/024455 A2 & JP 2000-502905 A	1-16
A	WO 2001/004286 A1 (株式会社ヘリックス研究所) 2001.01.18 & EP 1195434 A1	1-16
A	US 6022715 A (GENSET, S.A.) 2000.02.08 & WO 1996/034981 A2 & JP 11-510364 A	1-16
A	JP 2002-253237 A (理化学研究所) 2002.09.10 & US 2002/0106666 A1 & EP 1197552 A2	1-16
A	J. EDWARDS, et al., Oligodeoxyribonucleotide ligation to single-stranded cDNAs: a new tool for cloning 5' ends of mRNAs and for constructing cDNA libraries by in vitro amplification, Nucleic Acids Research, 1991, 19 (19), p. 5227-32	1-16
A	K. MARUYAMA, et al., Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides, Gene, 1994, 138, p. 171-4	1-16
A	I. EDERY, et al., An Efficient Strategy To Isolate Full-Length cDNAs Based on an mRNA Cap Retention Procedure (CAPture), Molecular and Cellular Biology, 1995, 15 (6), p. 3363-71	1-16
A	P. CARNINCI, et al., High-Efficiency Full-Length cDNA Cloning by Biotinylated CAP Trapper, GENOMICS, 1996, 37, p. 327-36	1-16
A	Y. SUZUKI, et al., Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end-enriched cDNA library, Gene, 1997, 200, p. 149-56	1-16
A	S. SEKINE, et al., Synthesis of full-length cDNA using DNA-capped mRNA, Nucleic Acids Symposium Series, 1993, No. 29, p. 143-4	1-16
A	菅野純夫, 完全長cDNA技術, BIO INDUSTRY, 1999, 16 (11), p. 19-26	1-16

請求の範囲 1-16

請求の範囲 1-16 に係る発明は、キャップ構造を有する mRNA からだけでなく、5' 端が欠失した mRNA 等のキャップ構造を有しない mRNA からも併せて cDNA を合成する方法であることを考えれば、高い割合での完全長 cDNA の合成をどのように実現するか、例えば、下記の文献に記載されたオリゴキャッピング法に比べて、どのように完全長 cDNA を高い割合で得るか不明である。したがって、上記請求の範囲に係る発明については、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施することができる程度に明確かつ十分に開示されていない。

1. K. MARUYAMA, et al., Oligo-capping: a simple method to replace the cap structure of eukaryotic mRNAs with oligoribonucleotides, Gene, 1994, 138, p. 171-4
2. S. KATO, et al., Construction of a human full-length cDNA bank, Gene, 1994, 150, p. 243-50
3. Y. SUZUKI, et al., Construction and characterization of a full length-enriched and a 5'-end-enriched cDNA library, Gene, 1997, 200, p. 149-56